



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> <b>A61K 7/48, 7/06, 35/78</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 94/13260</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 23 juin 1994 (23.06.94)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR93/01225 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 10 décembre 1993 (10.12.93)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 92/14968 11 décembre 1992 (11.12.92) FR 93/09492 2 août 1993 (02.08.93) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> LMVH RECHERCHE [FR/FR]; 48-50, rue de Seine, B.P. 79, F-92703 Colombes Cédex (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BONTE, Frédéric [FR/FR]; 5, place Charra, F-92400 Courbevoie (FR). MEYBECK, Alain [FR/FR]; Les Poissons, 20 ter, rue de Bezons, F-92400 Courbevoie (FR). DUMAS, Marc [FR/FR]; 54, rue de l'Industrie, F-92700 Colombes (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> USE OF A SIMAROUBA EXTRACT TO REDUCE PATCHY SKIN PIGMENTATION <b>(54) Titre:</b> UTILISATION D'UN EXTRAIT DE SIMAROUBA POUR L'ATTENUATION DES TACHES PIGMENTAIRES DE LA PEAU  <b>(57) Abstract</b> <p>A simarouba extract is used to produce a cosmetic or pharmaceutical, and particularly dermatological, composition or a skin cell culture medium. The resulting compositions are also disclosed. The simarouba extract has a significant skin depigmentation activity and can enhance the protective function of the skin, particularly its water barrier function, as well as having a significant keratinocyte differentiation activity.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne l'utilisation d'un extrait de Simarouba: Selon l'invention, on utilise un extrait de Simarouba pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules de peau. L'invention couvre aussi les compositions obtenues. L'extrait de Simarouba présente une activité dépigmentante significative, et permet de renforcer la fonction protectrice de la peau, en particulier la fonction de barrière hydrique, et présente également une activité de différenciation des kératinocytes significative.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

## UTILISATION D'UN EXTRAIT DE SIMAROUBA POUR L'ATTENUATION DES TACHES PIGMENTAIRES DE LA PEAU.

5           La présente invention concerne essentiellement l'utilisation d'un extrait de Simarouba pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, présentant notamment une activité dépigmentante et une activité favorisant la différenciation des kératinocytes, et destinée en particulier à l'atténuation des taches pigmentaires cutanées, notamment des taches  
10 de sénescence, au traitement du vitiligo, au renforcement de la fonction protectrice de la peau, ou à l'amélioration de l'aspect de la chevelure ; ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules de peau, et composition ainsi obtenue.

          Plus particulièrement l'invention est relative à l'utilisation d'un extrait de Simarouba pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, présentant notamment une activité dépigmentante ainsi qu'une activité favorisant la différenciation des kératinocytes, et destinée en particulier à traiter les taches pigmentaires cutanées, notamment des taches de sénescence, à traiter le vitiligo, les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglements de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à res-  
20 taurer, à préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment la fonction de barrière hydrique, ainsi que la cohésion des cellules de l'épiderme ou encore améliorer la qualité des cheveux ; ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules ou de tissus, notamment pour la culture en masse de cellules de peau, en particulier de kératinocytes.

25           La plante Simarouba est une plante de la famille des Simaroubacées. Parmi les plantes Simarouba, on peut citer Simarouba amara Aubl., Simarouba glauca, Simarouba versicolor et Simarouba excelsa. Ces plantes sont connues pour avoir des propriétés similaires (voir le livre de Mrs M. GRIEVE ayant pour titre "Modern Herbal" édité par Mrs C. F. LEYEL aux éditions PENGUIN BOOKS,  
30 pages 741-742). Simarouba amara Aubl., en particulier, est un arbre assez répandu en Guyane, dont l'écorce est utilisée par les indigènes comme remède pour traiter la dysenterie, améliorer la tonicité de l'intestin, promouvoir les sécrétions de l'intestin et prédisposer le patient à dormir.

          D'autre part, l'abrége Chemical Abstracts 110 (02) 013 432 décrit  
35 l'utilisation d'extrait de tige de Simarouba amara pour la mise en évidence in vitro d'une activité antiamibienne. De même, la revue Chemical Abstracts, résumé

109 (101) 000285 décrit un extrait de fruit de Simarouba amara pour la préparation d'un médicament anti-paludéen.

Or, les inventeurs de la présente invention ont pu observer que les extraits de Simarouba sont particulièrement actifs au niveau des mélanocytes en ce qui concerne l'inhibition de la mélanogénèse, cette activité ayant pu être mise en évidence par des essais in vitro sur des cultures de mélanocytes, qui seront décrits plus loin. De plus, on a pu observer que les extraits de Simarouba sont également particulièrement actifs pour favoriser la différenciation des kératinocytes et peuvent être ainsi utilisés pour traiter les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglement de la différenciation des kératinocytes. Cette différenciation se traduit en particulier, au niveau de l'épiderme, par une plus grande cohésion cellulaire, par une régulation de la transformation des kératinocytes en cornéocytes par perte du noyau et augmentation de la cornéification cellulaire, par une augmentation du nombre de couches de cornéocytes formant la couche cornée, l'ensemble de ces phénomènes contribuant au renforcement de la fonction protectrice de la peau vis-à-vis du milieu extérieur et au renforcement de la barrière hydrique empêchant la perte excessive d'eau par l'épiderme ; et, au niveau du follicule pileux, une régulation des processus de synthèse des kératines par les kératinocytes, ces protéines étant le constituant principal de la tige pileuse du cheveu et dont la qualité est essentielle pour un cheveu en bon état. En outre, les inventeurs ont pu observer que ces extraits permettaient de favoriser, d'accélérer et d'améliorer la différenciation des cellules de peau, en particulier des kératinocytes, lors de leur culture dans un milieu de culture.

Ainsi, la présente invention a pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une nouvelle formulation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques ayant une bonne efficacité de dépigmentation, en rendant ainsi possible son utilisation pour réaliser l'atténuation des taches pigmentaires cutanées, en particulier des taches de sénescence, ainsi que, dans le traitement du vitiligo, l'atténuation du contraste entre les zones atteintes par le vitiligo et leur entourage. On notera, à ce propos, que les taches de sénescence résultent de phénomènes complexes, comprenant généralement une hypercoloration locale liée à une hyperpigmentation et accompagnée parfois d'une hyperkératose localisée.

La présente invention a encore pour but principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une nouvelle formulation de composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, ayant une acti-

5 vité favorisant la différenciation des kératinocytes et destinée en particulier à traiter les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglement de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment la fonction de barrière hydrique, conduisant  
ainsi à un effet hydratant, en particulier en empêchant la perte excessive d'eau par l'épiderme, dont une application avantageuse est le traitement des peaux ichtyo-  
siques ainsi que le traitement des peaux psoriasiques, et à améliorer la qualité des cheveux, embellissant ainsi l'aspect de la chevelure.

10 La présente invention a encore pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de favoriser, d'accélérer et d'améliorer la différenciation de cellules de peau, notamment de kératinocytes, en culture.

15 La présente invention résout pour la première fois ces problèmes techniques de manière satisfaisante et utilisable à l'échelle industrielle pour la préparation de compositions cosmétiques ou dermatologiques, ou pour la préparation de milieux de culture notamment en masse de cellules de peau.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'un extrait de Simarouba pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, présentant notamment une  
20 activité dépigmentante, ainsi qu'une activité favorisant la différenciation des kératinocytes, et destinée en particulier à traiter les taches pigmentaires cutanées, notamment les taches de sénescence, à traiter le vitiligo, les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglement de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau,  
25 notamment la fonction de barrière hydrique, ainsi que la cohésion des cellules de l'épiderme ou encore à améliorer la qualité des cheveux ; ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules ou de tissus, notamment pour la culture en masse de cellules de peau, en particulier de kératinocytes.

30 Selon une caractéristique particulière, l'extrait précité est obtenu à partir de Simarouba amara (Aublet), Simarouba glauca, Simarouba versicolor ou Simarouba excelsa, notamment à partir des écorces de troncs, de tiges ou de racines de ces plantes.

Selon une autre caractéristique particulière, l'extrait précité est un  
35 extrait obtenu par extraction avec au moins un solvant polaire, tel que l'eau, un alcool, de préférence un alcool inférieur, tel que méthanol ou éthanol, un glycol, en

particulier le propylèneglycol, ou un mélange hydro-alcoolique en toute proportion.

Selon une autre caractéristique particulière, l'extrait précité est présent dans la composition à une concentration comprise entre 0,001 et 5 % en poids, exprimée en extrait sec, par rapport au poids total de la composition, de préférence entre 0,01 et 1 % et encore de préférence entre 0,1 et 0,5 % en poids.

Selon une autre caractéristique particulière, la composition précitée contient, en outre, un agent actif choisi parmi le groupe constitué par l'acide kojique et ses sels ou esters, l'acide caféique et ses sels ou esters, l'hydroquinone et ses dérivés, un extrait de mûrier, la trétinoïne, la vitamine A ou ses dérivés ou esters, un caroténoïde, notamment le bêta-carotène, la vitamine C, un corticoïde, le glutathion, la cystéine, l'acide parahydroxycinnamique ou ses sels ou esters, les sels, esters et dérivés des substances précitées étant choisis parmi ceux cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables.

Selon encore une autre caractéristique particulière, la composition précitée peut en outre contenir au moins un agent hydratant, tel que l'acide hyaluronique.

Selon une autre caractéristique particulière, l'extrait de mûrier précité est présent en une proportion en poids comprise entre 0,001 et 5 %, de préférence entre 0,01 et 1 %, encore de préférence entre 0,1 et 0,8 % en poids par rapport au poids total de la composition.

Selon encore une autre caractéristique particulière, l'acide kojique ou ses sels ou esters précités est présent dans la composition à une proportion en poids comprise entre 0,001 et 5 %, encore de préférence entre 0,01 et 2 %, en poids par rapport au poids total de la composition.

Selon une autre caractéristique particulière, l'extrait précité de Simarouba est au moins en partie incorporé dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou dans des liposomes, soit seul, soit combiné à au moins une autre substance active présente dans la composition.

La préparation des liposomes contenant au moins en partie l'extrait de Simarouba précité peut être réalisée selon l'un des procédés connus pour incorporer des substances actives dans des liposomes.

Selon un mode de réalisation préféré, selon la présente invention, on utilise un procédé d'atomisation des constituants de la phase lipidique, permettant d'obtenir une poudre lipidique facilement dispersible dans une solution aqueuse pour former des liposomes par exemple selon le procédé décrit dans le document

US-A-4 508 703. La suspension de liposomes ainsi obtenue peut être homogénéisée au moyen d'ultrasons, ou dans le cas d'une production de masse, au moyen d'une homogénéisation sous pression, conformément au procédé décrit dans US-A-4 621 023.

5 L'extrait de Simarouba précité peut être incorporé soit dans la phase lipidique soit dans la phase aqueuse des liposomes en particulier en utilisant les procédés précédemment décrits. Dans le cas de l'incorporation dans la phase lipidique des liposomes, on peut procéder comme suit. On dissout l'extrait de Simarouba avec les constituants de la phase lipidique, avant l'atomisation, dans  
10 une solution organique contenant au moins un lipide amphiphile, tel que la lécithine de soja, éventuellement un composé hydrophobe lipophile tel qu'un stérol, en particulier le cholestérol ou le  $\beta$ -sitostérol. De préférence, le solvant est choisi parmi le dichlorométhane, le chloroforme ou le méthanol, ou l'un de leurs mélanges.

15 La solution organique peut avantageusement contenir un agent anti-oxydant tel que l' $\alpha$ -tocophérol.

La poudre lipidique obtenue est dispersée dans un milieu aqueux convenable, par exemple une solution tampon PBS, une solution de glucose ou une solution de chlorure de sodium. On obtient ainsi une suspension de liposomes.

20 Selon un mode de réalisation avantageux, et surtout dans le cas d'une composition de liposomes, après avoir éventuellement homogénéisé la composition obtenue, les compositions de liposomes sont gélifiées par mélange avec un gel, tel qu'un gel de polymère vinylique, en particulier commercialisé sous la dénomination commerciale Carbopol® 940. Cette procédure de gélification est  
25 également décrite dans US-A-4 508 703, en particulier dans les exemples.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, la concentration de l'extrait de Simarouba précité est comprise entre 0,001 et 30% en poids, de préférence entre 0,01 et 10% en poids, de la phase lipidique desdits liposomes.

30 Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne aussi une composition cosmétique, ou pharmaceutique, notamment dermatologique, de préférence à application topique, présentant notamment une activité dépigmentante, ainsi qu'une activité favorisant la différenciation des kératinocytes, et destinée en particulier à traiter les taches pigmentaires cutanées, notamment des taches de sénescence, à traiter le vitiligo, les désordres cutanés s'accompagnant de  
35 dérèglement de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment la

fonction de barrière hydrique, en permettant ainsi notamment d'obtenir un effet hydratant en empêchant la perte excessive d'eau par l'épiderme, en permettant ainsi une utilisation notamment pour le traitement des peaux sèches, quel que soit le degré de sécheresse, y compris les peaux ichtyosiques, et les peaux psoriasiques, à  
5 améliorer la qualité des cheveux, conduisant ainsi à un embellissement de la chevelure, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité cosmétiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, efficace d'un extrait de Simarouba.

D'autres caractéristiques particulières de la composition cosmétique ou  
10 pharmaceutique, notamment dermatologique, apparaissent clairement à la partir de la description précédente concernant les diverses caractéristiques particulières de l'utilisation et apparaissent également pour l'homme de l'art à partir de la description complète de l'invention, notamment illustrée par les exemples qui vont suivre.

15 Une composition selon l'invention précédemment décrite contenant un extrait de Simarouba, éventuellement sous forme au moins en partie incorporée dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou dans des liposomes, peut se présenter sous différentes formes utilisables en cosmétique ou en dermatologie. Par exemple, ces compositions peuvent être des gels, des crèmes, des laits ou des  
20 lotions.

Ces compositions, appliquées sur les zones à traiter de la peau, ou du cuir chevelu, ont pour effet de réguler la différenciation des kératinocytes, en favorisant ainsi la formation et la restauration d'un épiderme de bonne qualité, notamment au niveau de la couche cornée, de renforcer la fonction de barrière  
25 cutanée protectrice de l'épiderme, en particulier de barrière hydrique, et d'obtenir un embellissement de la chevelure, comme ceci a été expliqué plus haut en ce qui concerne les effets et les avantages de cette différenciation.

Ainsi, selon un mode de réalisation particulier, la composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention présente un pouvoir hydratant, notamment en empêchant une perte excessive d'eau dans l'épiderme, et peut être destinée  
30 au traitement des peaux sèches, notamment des peaux ichtyosiques.

Selon un autre mode de réalisation particulier, la composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention permet de restaurer la différenciation normale des kératinocytes lors de leur transformation en cornéocytes, accompagnée de la perte du noyau et de la cornéification cellulaire. Ainsi, cette composition  
35 peut être destinée au traitement des peaux psoriasiques.



Dans ce cadre, habituellement l'extrait de Simarouba est incorporé dans un excipient cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable. Egalement, l'extrait de Simarouba peut être incorporé dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou des liposomes, comme cela a été décrit pour le premier aspect précédent.

Selon un troisième aspect, la présente invention concerne encore un milieu de culture de cellules ou de tissus, notamment pour la culture de cellules de peau, en particulier de kératinocytes, permettant de favoriser, accélérer et améliorer leur différenciation, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace d'un extrait de Simarouba pour obtenir une telle différenciation.

Selon un quatrième aspect, l'invention concerne encore un procédé pour favoriser, accélérer ou améliorer la différenciation des cellules de peau, en particulier des kératinocytes, notamment dans le cadre d'une culture en masse de cellules de peau, pour la production de peau artificielle ou pour la préparation de modèles de peau reconstituée, caractérisé en ce que l'on utilise un milieu de culture tel que défini dans la description précédente, ou dans la description suivante prise dans son ensemble.

Le procédé selon l'invention dit de différenciation cellulaire présente notamment un grand intérêt industriel. On citera par exemple :

– la production de médiateurs biochimiques par traitement de culture en masse de kératinocytes dans des bioréacteurs ;

– la préparation de peau artificielle en vue de réaliser des greffes de peau, le procédé de l'invention étant particulièrement avantageux dans le cas d'auto-greffes de grands brûlés, grâce au gain de temps qu'il procure dans la préparation d'une peau artificielle. En particulier, l'accélération et l'amélioration de la différenciation des kératinocytes se traduit par la formation plus rapide d'une couche cornée, de bonne qualité ;

– la réalisation de modèles de peau comprenant de la peau reconstituée, destinée par exemple à évaluer la pénétration cutanée ou la toxicité d'une substance ou composition appliquée par voie topique, lorsqu'elle est destinée en particulier à un traitement local ou à un traitement systémique (transderme), notamment .

Selon une variante de réalisation particulière, ce procédé de culture comprendra généralement la préparation d'un milieu de culture pour la croissance de kératinocytes humains comprenant un milieu de base nutritif DMEM (Gibco®), un facteur de croissance épidermique ("EGF"), 10% de sérum de veau foetal, de

l'isoprotérénol et/ou de la forskoline, ainsi que de l'hydrocortisone. Dans le cadre de l'invention, ce milieu comprend aussi un extrait de Simarouba tel que décrit dans la description précédente ou suivante, généralement à une concentration de 0,01 à 0,5% en poids.

5 Dans ce procédé, on réalise une culture en masse de cellules de peau en inoculant des kératinocytes afin de les immobiliser sur des supports tels que fibres creuses, des microbilles, ou des matrices microporeuses et cela à l'aide du milieu de culture ci-dessus. On peut assurer une perfusion du milieu afin d'avoir un apport suffisant à la croissance et la différenciation même lorsque la biomasse est  
10 importante.

Le milieu de culture selon l'invention peut avantageusement être utilisé pour la culture en masse de cellules de peau, en particulier de kératinocytes, pour la production de peau artificielle ou pour la préparation de modèles de peau reconstituée.

15 Selon un cinquième aspect la présente invention couvre encore un procédé de traitement cosmétique ou dermatologique des phénomènes d'hyperpigmentation cutanés, comprenant en particulier les taches de sénescence et autres taches pigmentaires cutanées, caractérisé en ce qu'on applique, au moins sur les taches pigmentaires cutanées à traiter, une quantité efficace d'un extrait de  
20 Simarouba pour obtenir leur atténuation. Avantageusement, cet extrait est obtenu à partir de la plante de Simarouba amara Aubl, notamment à partir des écorces. Des extraits particuliers ont été décrits dans la description précédente.

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention concerne encore un procédé de traitement cosmétique ou dermatologique du vitiligo, caractérisé en ce qu'on applique, au moins sur les zones pigmentées de la peau avoisinant celles dépigmentées par le vitiligo, une quantité efficace d'un extrait de  
25 Simarouba pour obtenir l'atténuation de la pigmentation desdites zones pigmentées, en atténuant ainsi le contraste entre les zones pigmentées atteintes par le vitiligo et leur entourage, ce qui améliore l'aspect esthétique du sujet.

30 De préférence, dans les différents aspects précédents de l'invention, la concentration en poids d'extrait de Simarouba dans la composition cosmétique ou dermatologique finale, est comprise entre 0,001 et 5%, de préférence encore entre 0,01 et 1% par rapport au poids total de la composition.

Dans le cas de l'utilisation dans un milieu de culture, selon une variante  
35 de réalisation particulière, on peut utiliser de 0,01 à 0,5% en poids d'extrait de Simarouba, par rapport au poids total du milieu de culture final.

D'autre part, selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, on peut introduire dans la composition cosmétique ou dermatologique un principe actif complémentaire, en particulier un agent hydratant tel que l'acide hyaluronique.

5 D'autre part, dans le cadre de l'invention, lorsque la composition est une composition cosmétique, l'extrait de Simarouba précité peut être avantageusement incorporé dans un excipient cosmétiquement acceptable.

De même, lorsque cette composition est une composition pharmaceutique, notamment dermatologique, l'extrait de Simarouba précité peut être  
10 incorporé dans un excipient pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, acceptable.

De tels excipients sont bien connus à l'homme de l'art et résultent également de la description de plusieurs exemples de compositions qui va suivre.

Suivant une variante particulière, l'excipient de la composition cosmétique, ou celui de la composition pharmaceutique, est au moins en partie constitué  
15 de particules solides de très petite dimension, en particulier de l'ordre de  $0,05\ \mu\text{m}$  à  $100\ \mu\text{m}$ , et l'extrait de Simarouba, en tant que substance active, est distribué, au moins en partie, à la surface desdites particules, comme décrit dans la demande de brevet français FR-A-2 685 635.

20 Ainsi, d'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative ci-après faite en référence à plusieurs exemples illustratifs de l'invention qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Dans la présente description, incluant les exemples, les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire.

25

#### Exemple 1 de l'invention

##### Extrait aqueux d'écorce de Simarouba

A partir d'un extrait d'écorce de racines de l'arbre Simarouba amara Aubl. en provenance de Guyane, on réalise une extraction avec de l'eau par  
30 extraction de type Soxhlet, c'est-à-dire au reflux pendant plusieurs heures. Le rapport solvant-écorce est en général de 10-1 en poids.

Après extraction, généralement on concentre cet extrait en vue d'une utilisation cosmétique ou pharmaceutique. L'extrait concentré est dénommé produit I1.

Naturellement, comme cela est bien compréhensible à l'homme de l'art, on peut poursuivre l'élimination du solvant, ici l'eau, jusqu'à obtention d'un extrait sec, par évaporation sous pression réduite ou par lyophilisation.

5

### Exemple 2 de l'invention

#### Extrait méthanolique d'écorce de racines de Simarouba

A partir de 100 g d'écorce de racines de l'arbre Simarouba amara (Aubl.) en provenance de Guyane, on réalise une extraction avec 1 l de méthanol selon la méthode dite de Soxhlet, pendant plusieurs heures à reflux.

10

Après extraction, l'extrait méthanolique est concentré jusqu'à obtention d'un produit contenant très peu de méthanol dénommé produit I2.

### Exemple 3

#### Mise en évidence de l'activité dépigmentante des extraits selon l'invention

15

L'activité dépigmentante des extraits selon l'invention est déterminée à différentes concentrations non cytotoxiques sur des cultures de mélanocytes de la lignée Cloudman S91 provenant de ATCC et portant la référence CCL 53.1 clone M-3. Chaque concentration d'extrait est testée sur trois boîtes de culture. Les boîtes de culture sont préparées en introduisant 200 000 cellules S91 par boîte dans un milieu de culture constitué de milieu EMEM complet contenant 2 % v/v de

20

sérum de veau foetal et 0,08 µg/ml de mitomycine C.

Après 24 h d'incubation à 37°C sous atmosphère humide, le milieu est renouvelé par un milieu identique contenant les produits à tester mais maintenant sans mitomycine C.

25

5 jours d'incubation après le renouvellement du milieu, les mélanocytes sont comptés avec un appareil de comptage tel que le "Counter Coulter®" et le contenu en mélanine des cellules est déterminé en mesurant l'absorbance à 405 nm puis en transformant cette valeur en quantité de mélanine au moyen d'une courbe étalon établie avec de la mélanine synthétique en provenance de la société SIGMA qui établit une relation linéaire entre des quantités connues de mélanine et l'absorbance à 405 nm. La quantité de mélanine est alors ramenée à 10<sup>6</sup> mélanocytes.

30

Parallèlement, une culture témoin de mélanocytes a été réalisée dans trois boîtes, avec la même lignée cellulaire et dans les mêmes conditions de culture, si ce n'est que le milieu de renouvellement introduit 24 h après l'incubation ne contient aucun produit à tester selon l'invention.

35

Les résultats obtenus en calculant pour chaque concentration d'extrait la moyenne sur les trois boîtes utilisées, sont répertoriés aux tableaux I et II pour chacun des produits I1 et I2 des exemples 1 et 2.

- La significativité des résultats est déterminée par le test statistique t de Student avec un seuil de 0,05, qui compare les cultures traitées avec les produits, aux cultures témoins, non traitées.

TABLEAU I

Produit I1 microgramme/ml	Nombre de cellules x 10 <sup>-3</sup>	Mélanine μg/10 <sup>6</sup> cellules	Activité A	t
0,5	222 ± 19	17 ± 1	+63 %	S
0,25	238 ± 3	27 ± 3	+41 %	S
0,1	234 ± 14	28 ± 4	+39 %	S
Témoin	236 ± 30	46 ± 2	0	

10

TABLEAU II

Produit I2 microgramme/ml	Nombre de cellules x 10 <sup>-3</sup>	Mélanine μg/10 <sup>6</sup> cellules	Activité A	t
0,5	214 ± 4	29 ± 2	+36 %	S
0,25	247 ± 16	30 ± 1	+34 %	S
0,1	244 ± 5	33 ± 2	+28 %	S
Témoin	236 ± 30	46 ± 2	0	

S = significatif.

15

L'activité dépigmentante A est calculée comme suit :

$$A = \frac{T - P}{T} \times 100$$

dans laquelle

- 20 T = teneur en mélanine en microgramme pour 10<sup>6</sup> cellules de l'échantillon témoin  
et

P = teneur en mélanine en microgramme pour 10<sup>6</sup> cellules du produit testé I1 ou I2.

Il apparaît, à partir du tableau I, que le produit I1 produit une activité dépigmentante d'au moins 39 % par rapport au témoin, même à la très faible dose de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , cette activité augmentant jusqu'à 63 % pour une dose de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

5 D'autre part, à partir du tableau II, on constate également que le produit I2 procure une activité dépigmentante d'au moins 28 % à la faible dose de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , cette activité augmentant jusqu'à 36 % pour la dose de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Ainsi, les produits I1 et I2 présentent une activité dépigmentante importante.

Par ailleurs, l'activité des produits I1 et I2 est significative dès la première dose testée de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

10

#### Exemple 4

##### Test d'activité d'extrait de Simarouba sur la différenciation des kératinocytes

15 Pour la présente étude, on utilise un prélèvement de peau effectué lors d'une opération de chirurgie esthétique de type "lifting" sur le visage d'une femme de 61 ans.

Au jour J=-2, on ensemence 12 puits d'une plaque de culture multi-puits avec  $10^5$  cellules par puits de kératinocytes isolés à partir de ce prélèvement dans un milieu de culture classique pour la culture des kératinocytes, bien connu de l'homme de l'art. Avantageusement, ce milieu de culture peut être constitué par 20 un milieu M199 additionné de 2 mM de L-glutamine, de 10% de sérum de veau foetal, de toxine cholérique, d'hydrocortisone, ainsi que du facteur de croissance épidermique EGF.

Aux jours J=0, J=4, J=7 et J=10, le milieu de culture est renouvelé par un milieu identique sur 6 des 12 puits qui constituent des puits témoins non traités, 25 et, sur les 6 puits restants, constituant les puits traités on renouvelle avec un milieu identique, mais dans lequel on a dissous 25  $\mu\text{g/ml}$  d'extrait de Simarouba tel qu'obtenu à l'exemple 1, et sur lesquels on réalise une filtration stérilisante sur filtre, par exemple à 0,22  $\mu\text{m}$ .

Au jour J=12, on réalise une numération cellulaire ainsi qu'une 30 inclusion des cellules en résine époxy après fixation et marquage des structures cellulaires à l'acétate d'uranyle.

On réalise une coupe de chacun des blocs de résine ainsi obtenus sous forme de coupe ultrafine, par exemple à l'aide d'un dispositif connu sous le nom de Microtome, et on observe celle-ci au microscope électronique à transmission.

35 On a ensuite observé chacune des 6 coupes de la culture témoin, d'une part, et des 6 coupes de la culture traitée par l'extrait de Simarouba, d'autre part.

On a pu observer que les cellules traitées avec l'extrait de Simarouba selon l'invention, par exemple l'extrait obtenu à l'exemple 1, présentent une différenciation cellulaire nettement supérieure au témoin, à savoir :

- plus de 10 couches cellulaires alors que le témoin présente 5 couches cellulaires en moyenne et au maximum 8 ;
- 3 à 4 couches intermédiaires composées de kératinocytes ayant une abondante activité cytoplasmique, des desmosomes et des tonofilaments nombreux et réguliers, tandis que la culture témoin présente des cellules n'ayant pas ces caractéristiques, et possède une architecture non régulière ;
- les couches supérieures présentent une cornification régulière avec plusieurs couches de cornéocytes présentant une enveloppe cornée épaisse et remplie de tonofilaments, tandis que les couches supérieures des témoins possèdent peu de cornéocytes et présentent donc une cornification très incomplète, une absence de grains de kératohyaline, la présence de restes d'organelles cellulaires, preuves d'une mauvaise différenciation.

Ces résultats nettement supérieurs sur la différenciation cellulaire obtenue avec l'extrait de Simarouba selon l'invention permet d'envisager l'application des extraits de Simarouba à la préparation de composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, en particulier suivante :

- des compositions favorisant la formation d'un épiderme bien différencié donc donnant une peau "belle" ayant un grain et un toucher agréables ;
- des compositions luttant contre les troubles de la différenciation épidermique, survenant notamment au cours du vieillissement ;
- des compositions renforçant la barrière cutanée donc protégeant des agressions externes, par exemple par des allergènes ou des tensioactifs, d'une part, et limitant la perte excessive d'eau par l'épiderme, d'autre part ;
- des compositions permettant d'améliorer la qualité de la chevelure notamment par une amélioration de la qualité de la kératine de la tige pileuse du cheveu provenant de l'activité des kératinocytes des follicules qui se différencient depuis la base du poil.

Egalement, on peut envisager l'application de ces extraits à la préparation de milieux de cultures cellulaires, en particulier destinés à la culture en masse de kératinocytes, ou de compositions destinées à traiter des cultures de kératinocytes pour favoriser la vitesse et/ou la qualité de l'architecture de ces cultures lorsqu'elles sont, en particulier, destinées à fabriquer des peaux artificielles, dites équivalentes pour greffes, en particulier sur des brûlés, ou bien

pour la préparation de modèles destinés à évaluer la toxicité ou la pénétration cutanée de diverses substances testées.

On donne ci-après divers exemples de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques selon l'invention, utilisant un  
5 extrait de Simarouba.

#### Exemple 5

##### Composition cosmétique ou dermatologique dépigmentante sous forme de gel

- |    |  |              |
|----|--|--------------|
| 10 | - extrait aqueux lyophilisé d'écorce de Simarouba amara de l'exemple 1.... | 0,3 g        |
|    | - propylèneglycol.....   | 4 g          |
|    | - éthanol.....   | 3 g          |
|    | - gel de Carbopol 940® à 2 % + conservateur.....                           | q.s.p. 100 g |

15 Ce gel est utilisé en application locale 2 fois par jour pendant 6 semaines sur les zones de la peau à dépigmenter.

#### Exemple 6

##### Composition cosmétique ou dermatologique contenant un extrait de Simarouba en liposomes, sous forme de gel

20 On prend 0,3 g de produit I2 de l'exemple 2 que l'on dissout dans 50 ml d'un mélange dichlorométhane-méthanol 8-2 (v/v) auquel on ajoute 9 g de lécithine de soja et 1 g de cholestérol.

La solution obtenue peut être traitée pour obtenir une suspension de  
25 liposomes par le procédé d'évaporation en récipient rotatif bien connu qui consiste à déposer une couche lipidique dans le ballon de l'évaporateur rotatif par évaporation du solvant, puis ajouter de l'eau ou une solution aqueuse appropriée contenant des conservateurs, bien connus à l'homme de l'art, pour obtenir 100 g de suspension aqueuse de liposomes.

30 Cette suspension peut être homogénéisée au moyen d'ultrasons à la puissance de 150 W pendant 10 min à 4°C.

La suspension de liposome homogénéisée obtenue est ensuite gélifiée par addition d'un poids équivalent de gel de Carbopol 940® à 2 %, neutralisé par la triéthanolamine.



On obtient ainsi une composition gélifiée contenant 0,15 % en poids de produit I2 incorporée au moins en partie dans la bicouche lipidique des liposomes, par rapport au poids total de la composition.

- 5 Cette composition peut être appliquée localement par exemple 1 fois par jour pendant 4 semaines, en vue d'atténuer les taches de sénescence.

#### Exemple 7

##### Gel dépigmentant

- |    |   |       |
|----|---|-------|
| 10 | - extrait aqueux d'écorce de racines de Simarouba amara (Aubl.) |       |
|    | selon l'exemple 1.....  | 0,2   |
|    | - extrait de murier.....  | 0,5   |
|    | - acide ascorbique.....   | 0,6   |
|    | - Carbopol 940®.....  | 2,0   |
| 15 | - eau + conservateurs.....q.s.p.                                | 100 g |

Ce gel est utilisé en applications locales sur les taches.

#### Exemple 8

##### 20 Crème blanchissante destinée à éclaircir la peau

- |    |   |       |
|----|---|-------|
|    | - extrait méthanolique d'écorce de racines de Simarouba amara (Aubl.) |       |
|    | selon l'exemple 2.....  | 0,3   |
|    | - Héliocarotte®.....  | 2     |
| 25 | - huile minérale.....   | 4,0   |
|    | - acide kojique.....  | 0,5   |
|    | - glycéryl stéarate.....  | 4,0   |
|    | - PEG 30 glycéryl stéarate.....                                       | 3     |
|    | - eau + conservateur.....q.s.p.                                       | 100 g |

30

HELIOCAROTTE® se présente sous forme d'une huile titrée à 0,05 % en  $\beta$ -carotène. Elle est disponible commercialement auprès de la société BERTIN, Courbevoie - France.

- 35 Cette crème est utilisée en applications locales, deux fois par jour par cures de quatre semaines.

Exemple 9Gel dermatologique dépigmentant

	- extrait éthanolique d'écorce de racines de	
5	Simarouba amara (Aubl.).....	0,45
	- acide rétinolique.....	0,01
	- alcool.....	30,0
	- Carbopol 940®.....	2,5
	- eau + conservateur et antioxydant.....q.s.p.	100 g

10

Les extraits éthanoliques précités ont été obtenus selon le procédé décrit à l'exemple 2, si ce n'est que l'on a remplacé le méthanol par de l'éthanol.

Ce gel est utilisé en application sur les zones foncées, deux fois par jour, pendant trois semaines.

15

Exemple 10Lait éclaircissant la peau

	- extrait aqueux d'écorce de racines de Simarouba amara (Aubl.) selon l'exemple 1.....	1,5
20	- hydroquinone.....	1,5
	- Héliocarotte®.....	2
	- huile de germes de blé.....	3
	- linoléate de tocophérol.....	0,5
	- glycérine.....	2
25	- Carbopol.....	0,5
	- glycéryl stéarate.....	2,0
	- PEG 30 glycéryl stéarate.....	3,0
	- parfums + solubilisant.....	0,15
	- eau + conservateur.....q.s.p.	100 g

30

Ce lait est utilisé en application après la douche sur les parties du corps à traiter, une fois par jour par cures de deux à trois semaines.

35

Exemple 11Composition dermatologique pour la restauration de la barrière hydrique de l'épiderme

5	- extrait aqueux Simarouba de l'exemple 1.....	0,5 g
	- Cremophor RH 40®.....	1 g
	- Carbomer 980®.....	0,2 g
	- triéthanolamine.....	0,18 g
	- PEG 6-30 de stéarate.....	7 g
10	- Cétyl alcool.....	2 g
	- huiles végétales.....	25 g
	- excipient aqueux parfumé.....q.s.p.	100 g

On mélange les composants de manière classique pour obtenir une émulsion traitante appliquée matin et soir en massant légèrement les zones à traiter. Cette émulsion s'utilise comme crème de jour et/ou de nuit.

Exemple 12Composition dermatologique pour le traitement de peaux psoriatiques

20	- extrait méthanolique de Simarouba de l'exemple 2.....	0,3 g
	- gel de Carbopol 980® à 2%.....	35 g
	- excipient aqueux parfumé.....q.s.p.....	100 g

On introduit l'extrait de Simarouba dans l'excipient aqueux pour le disperser, puis on ajoute le gel de Carbopol de manière à obtenir une composition gélifiée que l'on applique localement sur les lésions pendant 6 semaines.

Exemple 13Composition cosmétique pour maintenir un état d'hydratation satisfaisant de l'épiderme

	- extrait méthanolique de Simarouba de l'exemple 2.....	0,18 g
	- $\alpha$ -bisabolol.....	0,1 g
35	- acide hyaluronique.....	1 g
	- urée.....	3 g

- excipient cosmétiquement acceptable  
sous forme d'un lait pour le corps.....q.s.p..... 100 g

5 Appliquer le lait sur les zones à traiter, en particulier sur les jambes après l'épilation. Cette composition permet en particulier de renforcer la fonction de barrière hydrique cutanée de l'épiderme par l'amélioration de la cohésion inter-cellulaire épidermique. Elle permet ainsi à la peau de conserver un état d'hydratation satisfaisant.

10

Exemple 14

Composition cosmétique liposomale pour rééquilibrer la desquamation de la couche cornée de l'épiderme, et redonner un épiderme lisse

- extrait méthanolique de Simarouba de l'exemple 2..... 0,1 g
- 15 - lécithine de soja..... 2 g
- $\beta$ -sitostérol..... 0,2 g
- émulsion crème cosmétique à base de squalane  
de type huile-dans-eau, q.s.p..... 100 g

20

Dans une première étape, on prépare une suspension aqueuse de liposomes encapsulant l'extrait méthanolique de Simarouba de l'exemple 2 dans la phase lipidique desdits liposomes. Pour cela, on procède de la manière suivante.

25 On dissout 0,1 g de l'extrait méthanolique de Simarouba de l'exemple 2, 2 g de lécithine de soja et 0,2 g de  $\beta$ -sitostérol dans 50 ml d'un mélange 4:1 de dichlorométhane et de méthanol. Cette solution est évaporée sous pression réduite (200 mm de mercure environ) dans un ballon rotatif porté à 45°C. Le film lipidique obtenu est repris par 25 ml d'une solution aqueuse de phosphate monopotassique à 0,2 g/l et de phosphate disodique à 1,44 g/l, sous agitation pendant 1 h.

30 On obtient ainsi environ 25 ml d'une suspension de liposomes encapsulant l'extrait de Simarouba que l'on soumet ensuite à une homogénéisation aux ultrasons (15 mn, 150 W, 4°C).

Dans une deuxième étape, on incorpore de manière classique la suspension de liposomes obtenue à l'excipient émulsionné, pour obtenir la crème selon l'invention.

35

On peut appliquer quotidiennement la crème sur le visage en cas de peau rugueuse se desquamant par écailles.

Cette composition renforce la cohésion de la couche cornée et régularise le détachement des cellules mortes.

5

#### Exemple 15

Composition cosmétique contenant un extrait de Simarouba, destinée au traitement préventif des peaux sèches

- |    |   |       |
|----|---|-------|
| 10 | - extrait méthanolique de Simarouba obtenu à l'exemple 2..  | 0,5 g |
|    | - excipient émulsion crème de type huile-dans-eau, q.s.p... | 100 g |

On incorpore de manière classique l'extrait méthanolique de Simarouba de l'exemple 2 dans l'excipient émulsion crème, pour obtenir la crème selon l'invention.

15

On peut appliquer quotidiennement la crème sur les parties du corps que l'on souhaite traiter.

#### Exemple 16

20 Composition cosmétique contenant un extrait de Simarouba destiné au traitement des peaux ichtyosiques

- |    |   |       |
|----|---|-------|
|    | - glycérol.....   | 3 g   |
|    | - acide hyaluronique.....                                 | 1 g   |
| 25 | - extrait aqueux de Simarouba de l'exemple 1.....         | 0,2 g |
|    | - excipient émulsion crème de type huile-dans-eau, q.s.p. | 100g  |

On incorpore de manière classique l'extrait aqueux de Simarouba obtenu à l'exemple 1 ainsi que le glycérol et l'acide hyaluronique, à l'excipient émulsion crème pour obtenir la crème selon l'invention.

30

On applique quotidiennement cette crème sur les zones souhaitées de la peau, jusqu'à obtention d'une peau beaucoup plus lisse grâce à un renouvellement régulier de la couche cornée.

35

### Exemple 17

#### Préparation d'un milieu de culture et son utilisation pour la culture en masse de cellules de peau

Pour la préparation de ce milieu de culture ainsi que pour son utilisation pour la culture en masse de cellules de peau, l'homme de l'art pourra se reporter notamment à l'article de Philip C. Familletti et al. dans Biotechnology, vol. 6, janvier 1988, pages 41 à 44 ainsi qu'aux références citées dans cet article, en particulier Arathoon et al. dans la revue Science (1986), 232, page 1390 et suivantes ; l'article de Ku, K. et al. dans la revue Biotechnology, Bioeng. (1980), 23, pages 79 et suivantes.

Ainsi, on prépare un milieu de culture optimal pour la croissance de kératinocytes humains comprenant un milieu de base nutritif DMEM (Gibco®), du facteur de croissance EGF, 10 % de sérum de veau foetal, de l'isoprotérénol et/ou de la forskoline, ainsi que de l'hydrocortisone.

Ce milieu comprendra un extrait de Simarouba selon l'invention, de préférence à la concentration de 0,01 à 0,5 % en poids d'extrait de Simarouba par rapport au poids total du milieu de culture final.

On réalise une culture à base de cellules de peau en inoculant des kératinocytes afin de les immobiliser sur des supports tels que fibres creuses, des microbilles, ou des matrices microporeuses et cela à l'aide du milieu de culture décrit précédemment. Une perfusion en milieu dans un système à perfusion du type de celui-ci décrit par Sylvie GUICHARD-BALESTRINI dans la revue Biofutur, supplément n°56, avril 1987, pages 2 à 14, sera assurée afin d'avoir un apport suffisant à la croissance et à la différenciation même lorsque la biomasse est importante.

En fin de culture, on récupère les substances sécrétées par les kératinocytes, contenant principalement des lipides, sources de matière première pour la formulation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques à application topique sur l'épiderme ou le cuir chevelu.

Grâce au produit de l'invention, il est possible de traiter des cultures de peau reconstituées, en particulier des cultures de kératinocytes ou d'autres cellules épidermiques cultivées sur un support approprié, tel qu'un support collagénique (contenant ou non des fibroblastes), par exemple décrit dans le document La Recherche, (1987), n°185, pages 149-159 et dans Br. J. Dermatol. (1986), 114, pages 91-101, ou un support constitué par du derme excisé.

Grâce à l'utilisation de la composition selon l'invention, on obtiendra une épidermisation plus rapide et plus complète. Ceci permettra dans des délais plus courts de fournir aux médecins de la peau reconstituée, une sorte de pansement biologique pour les autogreffes, par exemple dans le cas de brûlures étendues. L'invention permettra également de réaliser de façon industrielle et concurrentielle des peaux reconstituées de bonne qualité pour réaliser des tests de pénétration ou de tolérance.

- 5
- L'invention comprend naturellement tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs diverses combinaisons.
- 10
- L'invention couvre également toute caractéristique qui apparaît être nouvelle vis-à-vis d'un état de la technique quelconque, à partir de la présente description prise dans son ensemble.

### REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'un extrait de Simarouba pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, présentant notamment une activité dépigmentante ainsi qu'une activité favorisant la différenciation des kératinocytes, et destinée en particulier à traiter les taches pigmentaires cutanées, notamment les taches de sénescence, à traiter le vitiligo, les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglement de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis ; à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment la fonction de barrière hydrique, ainsi que la cohésion des cellules de l'épiderme ou encore à améliorer la qualité des cheveux ; ou pour la préparation d'un milieu de culture de cellules ou de tissus, notamment pour la culture en masse de cellules de peau, en particulier de kératinocytes.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait précité est obtenu à partir de Simarouba amara (Aublet), Simarouba glauca, Simarouba versicolor ou Simarouba excelsa, notamment à partir des écorces de troncs, de tiges ou de racines de ces plantes.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'extrait précité est un extrait obtenu par extraction avec au moins un solvant polaire, tel que l'eau, un alcool, de préférence un alcool inférieur, tel que méthanol ou éthanol, un glycol, en particulier le propylèneglycol, ou un mélange hydro-alcoolique en toute proportion.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'extrait précité est présent dans la composition à une concentration comprise entre 0,001 et 5 % en poids, exprimée en extrait sec, par rapport au poids total de la composition, de préférence entre 0,01 et 1 % et encore de préférence entre 0,1 et 0,5 % en poids.
5. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition précitée contient, en outre, un agent actif choisi parmi le groupe constitué par l'acide kojique et ses sels ou esters, l'acide caféique et ses sels ou esters, l'hydroquinone et ses dérivés, un extrait de mûrier, la trétinoïne, la vitamine A ou ses dérivés ou esters, un caroténoïde, notamment le bêta-carotène, la vitamine C, un corticoïde, le glutathion, la cystéine, l'acide parahydroxycinnamique ou ses sels ou esters, les sels, esters et dérivés des



substances précitées étant choisis parmi ceux cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables.

5 6. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition précitée peut en outre contenir au moins un agent hydratant, tel que l'acide hyaluronique.

7. Utilisation selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que l'extrait de mûrier précité est présent en une proportion en poids comprise entre 0,001 et 5 %, de préférence entre 0,01 et 1 %, encore de préférence entre 0,1 et 0,8 % en poids par rapport au poids total de la composition.

10 8. Utilisation selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que l'acide kojique ou ses sels ou esters précités est présent dans la composition à une proportion en poids comprise entre 0,001 et 5 %, encore de préférence entre 0,01 et 2 %, en poids par rapport au poids total de la composition.

15 9. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait précité de Simarouba est au moins en partie incorporé dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou dans des liposomes, soit seul, soit combiné à au moins une autre substance active présente dans la composition.

20 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la concentration de l'extrait de Simarouba précité est comprise entre 0,001 et 30% en poids, de préférence entre 0,01 et 10% en poids, de la phase lipidique desdits liposomes.

25 11. Composition cosmétique, ou pharmaceutique, notamment dermatologique, de préférence à application topique, présentant notamment une activité dépigmentante, ainsi qu'une activité favorisant la différenciation des kératinocytes, et destinée en particulier à traiter les taches pigmentaires cutanées, notamment des taches de sénescence, à traiter le vitiligo, les désordres cutanés s'accompagnant de dérèglement de la différenciation des kératinocytes, tels que le psoriasis, à restaurer, préserver et/ou renforcer la fonction protectrice de la peau, notamment la fonction de barrière hydrique, en permettant ainsi notamment d'obtenir un effet  
30 hydratant en empêchant la perte excessive d'eau par l'épiderme, en permettant ainsi une utilisation notamment pour le traitement des peaux sèches, quel que soit le degré de sécheresse, y compris les peaux ichtyosiques, et les peaux psoriasiques, à améliorer la qualité des cheveux, conduisant ainsi à un embellissant de la chevelure, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité cosmétiquement ou  
35 pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, efficace d'un extrait de Simarouba.

12. Composition cosmétique selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'excipient est au moins en partie constitué de particules solides de très petite dimension, en particulier de l'ordre de 0,05  $\mu\text{m}$  à 100  $\mu\text{m}$ , et que l'extrait de Simarouba, en tant que substance active, est distribué, au moins en partie, à la surface desdites particules.

13. Composition selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que la composition est telle que définie à l'une quelconque des revendications 2 à 9.

14. Milieu de culture de cellules ou de tissus, notamment pour la culture de cellules de peau, en particulier de kératinocytes, permettant de favoriser, d'accélérer et d'améliorer leur différenciation, caractérisé en ce qu'il comprend une quantité efficace d'un extrait de Simarouba pour obtenir une telle différenciation.

15. Milieu de culture selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend de 0,01 à 0,5% en poids d'extrait de Simarouba par rapport au poids total du milieu de culture final.

16. Milieu de culture selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'il est utilisé pour la culture en masse de cellules de peau, en particulier de kératinocytes, pour la production de peau artificielle ou pour la préparation de modèles de peau reconstituée.

17. Procédé pour favoriser, accélérer ou améliorer la différenciation des cellules de peau, en particulier des kératinocytes, notamment dans le cadre d'une culture en masse de cellules de peau, pour la production de peau artificielle ou pour la préparation de modèles de peau reconstituée, caractérisé en ce qu'on utilise un milieu de culture tel que défini dans l'une des revendications 14 à 16.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on prépare un milieu de culture pour la croissance de kératinocytes humains comprenant un milieu de base nutritif DMEM, un facteur de croissance épidermique EGF, 10% de sérum de veau foetal, de l'isoprotérénol et/ou de la forskoline, ainsi que de l'hydrocortisone.

19. Procédé de culture selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce qu'on réalise une culture en masse de cellules de peau en inoculant des kératinocytes afin de les immobiliser sur des supports tels que fibres creuses, des microbilles, ou des matrices microporeuses, éventuellement en assurant une perfusion du milieu afin d'avoir un apport suffisant à la croissance et la différenciation même lorsque la biomasse est importante.

20. Procédé de traitement cosmétique des phénomènes d'hyperpigmentation cutanée, comprenant en particulier les taches de sénescence et autres taches pigmentaires cutanées, caractérisé en ce qu'on applique, au moins sur les taches pigmentaires cutanées à traiter, une quantité efficace d'un extrait de  
5 Simarouba pour obtenir leur atténuation, cet extrait étant avantageusement obtenu à partir de la plante de Simarouba citée à la revendication 2, notamment à partir des écorces.

21. Procédé de traitement cosmétique du vitiligo, caractérisé en ce qu'on applique au moins sur les zones pigmentées de la peau avoisinant celles  
10 dépigmentées par le vitiligo, une quantité efficace d'un extrait de Simarouba pour obtenir l'atténuation de la pigmentation desdites zones pigmentées, cet extrait de Simarouba étant avantageusement obtenu à partir de la plante telle que définie à la revendication 2, notamment à partir des écorces.